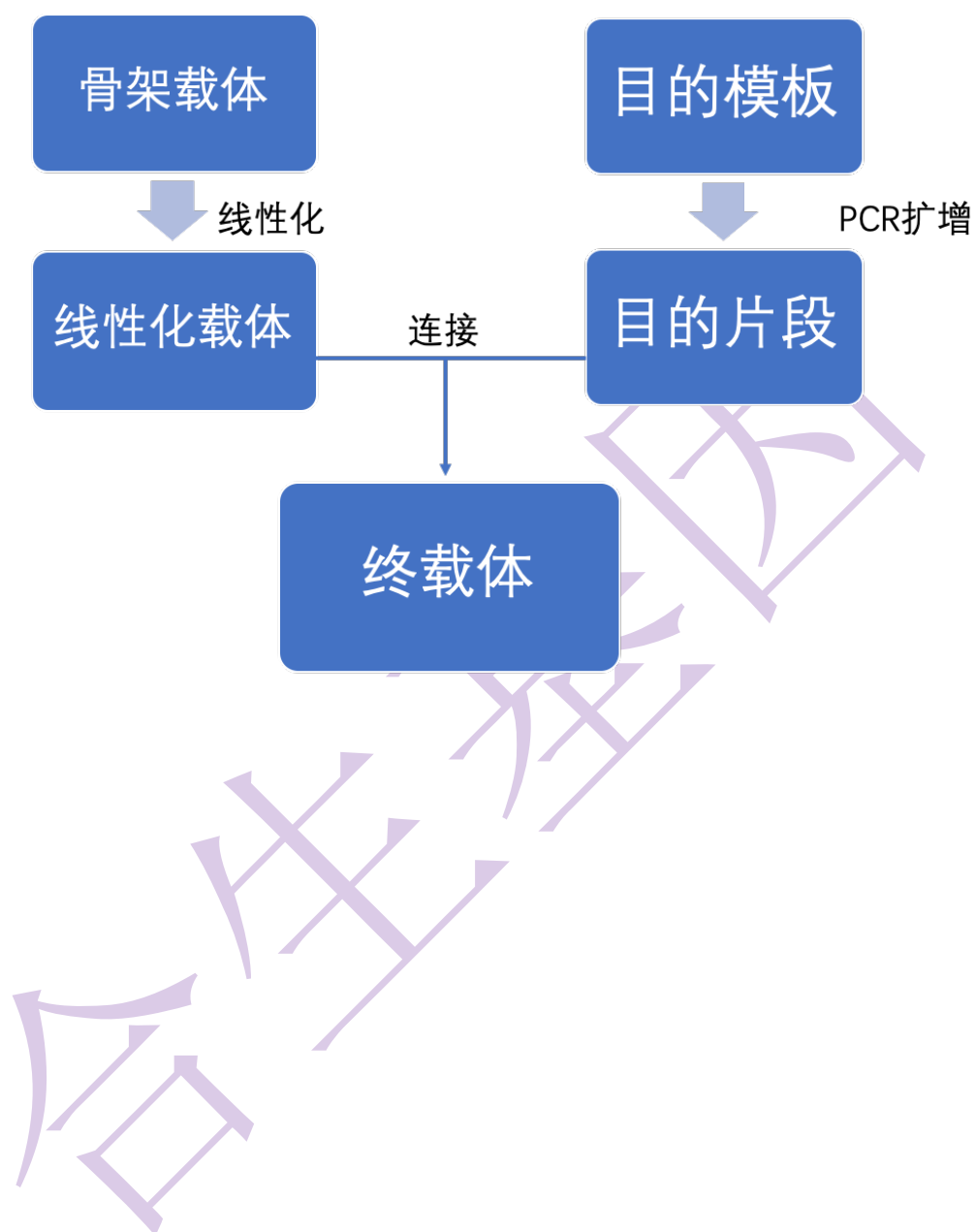


过表达慢病毒载体构建手册

1. 服务流程	2
2. 仪器与试剂	3
3. 构建实例	4
3.1. 基因过表达慢病毒载体构建	4
3.1.1. 目的基因	4
3.1.2. 载体信息	4
3.1.1. 载体图谱：	4
3.2. 质粒构建步骤	5
3.2.1. 合成引物	5
3.2.2. PCR 产物片段检测和回收	5
3.2.3. 载体酶切	5
3.2.4. 连接	6
3.2.5. 转化涂板及菌斑鉴定	6
3.2.6. 阳性克隆摇菌及质粒提取	6
3.2.7. 质粒质控（酶切鉴定和目的基因测序）	7

1. 服务流程



2. 仪器与试剂

表 1 主要仪器及生产商

仪器名称	生产厂家
Sorvall Legend Mircro 17 台式离心机	美国 ThermoFisher 公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
生物安全柜	新加坡 ESCO 公司
实验室耗材 I (移液枪头、1.5/2.0 mL 离心管)	美国 Axygen 公司
实验室耗材 II (细胞培养皿、移液管等)	美国 Corning 公司
凝胶成像分析系统	北京赛智创业科技有限公司
凝胶电泳系统	美国 BioRad 公司

表 2 主要试剂及生产商

试剂名称	生产厂家
质粒小量快速提取试剂盒 (离心柱型)	北京艾德莱生物科技有限公司
限制性内切酶类	美国 NEB 公司/ ThermoFisher 公司
DNA Ligase	北京合生基因科技有限公司

3. 构建实例

以 EPCAM (Human) 基因为例描述载体构建过程。

3.1. 基因过表达慢病毒载体构建

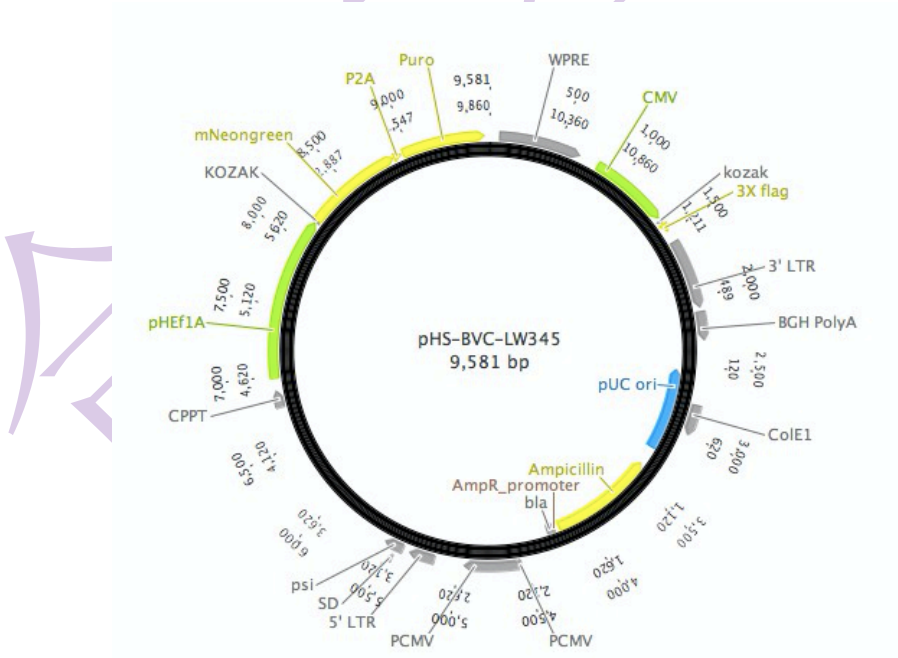
3.1.1. 目的基因

目的基因	转录本	物种	序列长度
EPCAM	NM_002354	Human	945bp

3.1.2. 载体信息

载体编号	载体元件	原核抗性
XX	pLV-hef1a-mNeongreen-P2A-Puro-WPRE-CMV-EPCAM -3Xflag	AMP

3.1.1. 载体图谱：



过表达慢病毒空载体示例

3.2.质粒构建步骤

3.2.1. 合成引物

PCR 扩增目的片段，PCR 体系如下：

2×Buffer	25 μL
Enzyme	1 μL
2mM dNTP	10 μL
Primer1	1.5 μL
Primer2	1.5 μL
template	适量
ddH ₂ O	Add to 50 μL

备注：模板一般用量 1-100ng，最佳模板用量根据实际情况而定。

反应条件：

1 cycle	30 cycles			1 cycle	1cycles
95°C	98°C	55°C	72°C	72°C	4°C
4min	30s	30s	1min	7min	

3.2.2. PCR 产物片段检测和回收

- 1) PCR 扩增完成后，需进行凝胶电泳检测扩增的条带是否正确，正确的条带进行切胶回收；
- 2) 骨架载体酶切和 PCR 产物片段回收；
- 3) 得到回收产物后，将其与骨架载体使用同样的限制性内切酶进行酶切消化。

3.2.3. 载体酶切

酶切骨架载体，对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收目的条带：

酶切体系:

10x buffer	2 μ L
酶 1	1 μ L
酶 2	1 μ L
Plasmid/product	2~3 μ L
Add ddH ₂ O to	20 μ L

3.2.4. 连接

得到回收产物后，选用 T4 连接酶进行连接，其反应体系如下所示：

反应体系

10× T4 ligase buffer	1 μ L
T4 ligase	1 μ L
PCR 回收产物	100 ng
骨架载体回收产物	100 ng
Add ddH ₂ O to	10 μ L

反应条件：16℃ 恒温金属浴反应0.5-1 h，之后取出进行转化。

3.2.5. 转化涂板及菌斑鉴定

无缝拼接后产物 5-10 μ L 转化至 100 μ L 感受态，42℃ 金属浴，热激 1 min，冰上迅速预冷 2 min，在超净工作台中，加入 600 μ L 无抗培养基，37℃ 摇床振荡培养 1 h，取适量菌液涂布在含有相应抗生素的平板上，在恒温培养箱中倒置培养 12-16 h。菌落 PCR 后鉴定阳性克隆，

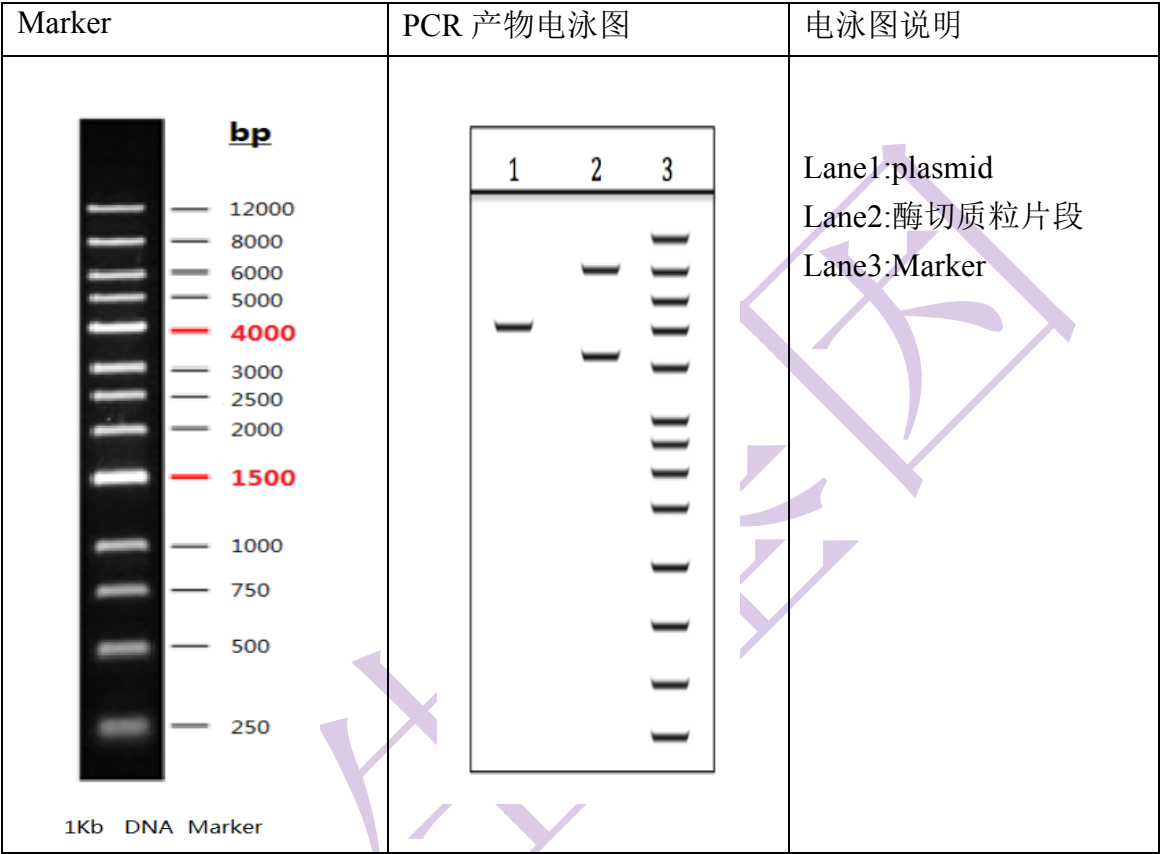
3.2.6. 阳性克隆摇菌及质粒提取

挑选 3-4 个单菌落摇菌，加入相应抗性培养基摇菌过夜（8 mL LB 液体培养基），然后参照质粒抽提试剂盒进行质粒抽提。

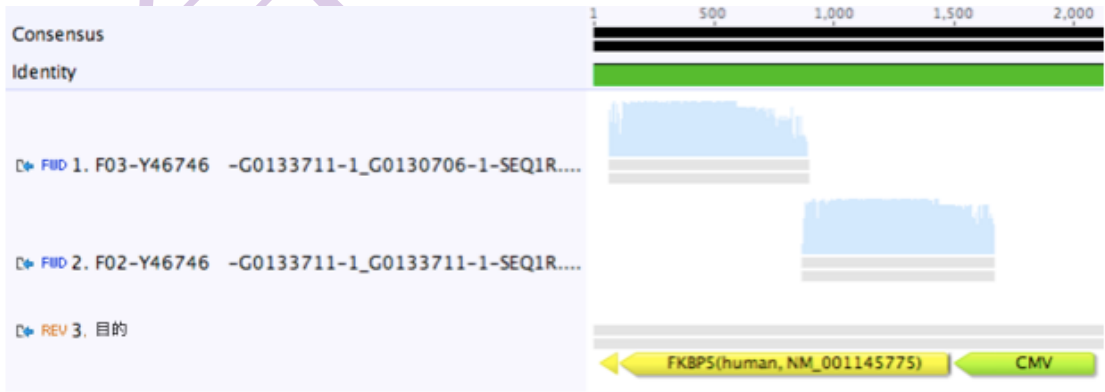
3.2.7. 质粒质控（酶切鉴定和目的基因测序）

完成过表达慢病毒质粒构建后 ,分别使用限制性内切酶对质粒进行了酶切鉴定以及目的基因的测序比对鉴定，以获得构建正确的质粒。

电泳结果示例



目的基因测序比对结果



目的基因序列信息

载体编号	基因 CDS 序列
目的基因	<p>基因名称：EPCAM； CDS: NM_002354</p> <p>5-ATGGCGCCCCCGCAGGTCCTCGCGTTCGGGCTTCTGCTTGCCGCGG CGACGGCGACTTTTGCCGCAGCTCAGGAAGAATGTGTCTGTGAAAAC ACAAGCTGGCCGTAAACTGCTTTGTGAATAATAATCGTCAATGCCAGT GTACTTCAGTTGGTGCACAAAATACTGTCATTTGCTCAAAGCTGGCTGC CAAATGTTTGGTGATGAAGGCAGAAATGAATGGCTCAAACTTGGGA GAAGAGCAAAACCTGAAGGGGCCCTCCAGAACAATGATGGGCTTTAT GATCCTGACTGCGATGAGAGCGGGCTCTTTAAGGCCAAGCAGTGCAA CGGCACCTCCATGTGCTGGTGTGTGAACACTGCTGGGGTCAGAAGAAC AGACAAGGACACTGAAATAACCTGCTCTGAGCGAGTGAGAACCTACT GGATCATCATTGAACTAAAACACAAAGCAAGAGAAAAACCTTATGATA GTAAAAGTTTGCGGACTGCACTTCAGAAGGAGATCACAACGCGTTATC AACTGGATCCAAAATTTATCACGAGTATTTTGTATGAGAATAATGTTAT CACTATTGATCTGGTTCAAATTCTTCTCAAAAAACTCAGAATGATGTG GACATAGCTGATGTGGCTTATTATTTTGAAAAAGATGTTAAAGGTGAAT CCTTGTTTCATTCTAAGAAAATGGACCTGACAGTAAATGGGGAACAAC TGGATCTGGATCCTGGTCAAACCTTAATTTATTATGTTGATGAAAAAGC ACCTGAATTCTCAATGCAGGGTCTAAAAGCTGGTGTTATTGCTGTTATT GTGGTTGTGGTGATAGCAGTTGTTGCTGGAATTGTTGTGCTGGTTATTT CCAGAAAGAAGAGAATGGCAAAGTATGAGAAGGCTGAGATAAAGGA GATGGGTGAGATGCATAGGGAACTCAATGCA-3'</p>